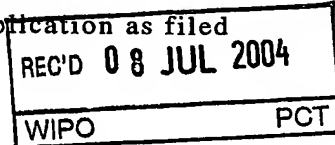


日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

21.05.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.



出願年月日  
Date of Application: 2003年 6月13日

出願番号  
Application Number: 特願2003-170011  
[ST. 10/C]: [JP2003-170011]

出願人  
Applicant(s): 学校法人日本大学

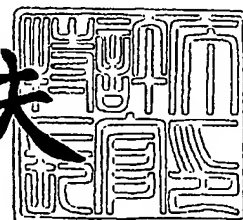
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 6月21日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P-NU004

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 5/08

【発明者】

【住所又は居所】 東京都千代田区九段南4丁目8番24号 学校法人 日本大学内

【氏名】 加野 浩一郎

【特許出願人】

【識別番号】 899000057

【氏名又は名称】 学校法人 日本大学

【代理人】

【識別番号】 100090941

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤野 清也

【選任した代理人】

【識別番号】 100113837

【弁理士】

【氏名又は名称】 吉見 京子

【選任した代理人】

【識別番号】 100076244

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤野 清規

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014834

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1  
【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 成熟脂肪細胞由来の骨芽細胞および筋芽細胞

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 脂肪組織由来の成熟脂肪細胞を脱分化させた前駆脂肪細胞株を用い、他の機能を有する細胞への分化転換を誘導する培養方法。

【請求項 2】 脂肪組織由来の成熟脂肪細胞が皮下脂肪組織由来の成熟脂肪細胞である請求項 1 に記載の培養方法。

【請求項 3】 分化転換された他の細胞が骨芽細胞である請求項 1 に記載の培養方法。

【請求項 4】 分化転換された他の細胞が筋芽細胞である請求項 1 に記載の培養方法。

【請求項 5】 請求項 1 ～ 4 のいずれかの培養方法を用いて分化転換された細胞。

【請求項 6】 細胞が骨芽細胞である請求項 5 に記載の細胞。

【請求項 7】 細胞が筋芽細胞である請求項 5 に記載の細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は動物およびヒトの脂肪組織由来の成熟脂肪細胞を脱分化させた前駆脂肪細胞株を用い、他の細胞への分化転換を誘導する培養方法および樹立された細胞に関する。

【0002】

【従来の技術】

人間の体の失われた部分や機能しなくなった部分を交換する方法として、義足、義歯などの人工物で補う方法や、他人の体の一部を用いた皮膚、角膜などの組織を移植する方法がある。腎臓、心臓、肺などの臓器の移植は19世紀から20世紀にかけて普及した。これらの代替物のうち、人工物を使用するものとして、1945年頃から人工腎臓（透析器）が発達し、現在広く使用されている。心臓、肺の機

能の一部を代行する人工呼吸器、人工心臓なども作られたが、これらのほとんどは体外で使用する装置であるため、使用の制約が大きい。また複雑な機能を持つ肝臓においては、人工肝臓が開発される可能性は低い。従って、臓器を人工物と代替することによって生体の機能を完全に補うことは難しい。

#### 【0 0 0 3】

腎臓、心臓、肝臓などの臓器は多様な機能を持っており、これらの臓器が本来の機能を果たさなければ、人間は死に至る。そこで、生体の本来の機能を完全に補うために、他の人間や動物の健康な臓器と機能しない臓器を交換する生体由来の臓器移植による治療が行われるようになっていく。

生体由来の臓器を移植することにより、人工物による代替が困難であった心臓や肺、またほぼ人工物の開発が不可能であった肝臓においても、生体の機能を補うことが可能となった。臓器移植の治療を受ける人は年々増加しており、日本においては年間700件以上の腎臓移植や、400件以上の肝臓移植が行われている。また心臓移植や肺移植において件数はまだ少ないが、確実に患者の生存率を高めており、臓器移植は効果的な治療方法として確立されている。

#### 【0 0 0 4】

しかし、一方で生体由来の臓器を移植することは、免疫的な拒絶反応や感染症などを引き起こす可能性が高く、移植した後にこれらの影響で死亡する例も多い。また、ドナー不足により移植を望みながら待機している患者が多く、年間の移植実施数に対し、待機者の死亡数が上回っている。さらに臓器移植を受けた場合でも、移植や予後の治療に莫大な費用がかかるなど、生体由来の臓器移植における問題点は多い。このような臓器移植の問題点を克服するために、新しい治療方法として再生医療が注目され、大きな関心が寄せられている。

#### 【0 0 0 5】

再生医療とは、人間の体の失われた部分や機能しなくなった部分に対し、多能性および自己複製能力を有する細胞を分化させ、組織や器官を再構築することの特徴とした治療方法である。この治療は患者本人の細胞を使用する自家移植が可能であり、免疫的な拒絶反応や感染をひきおこす可能性が低い。また、細胞を用いて組織や器官を形成するため、ドナー不足の解決につながる新しい治療方法

として期待されている。

再生医療に使用可能なドナー細胞としては、受精卵に由来する胚性幹細胞(ES細胞；Embryonic Stem Cell)と骨髄間質由来の体性幹細胞(MS細胞；Marrow Stem Cell)などが知られている。

#### 【0006】

ES細胞は受精卵由来の未分化な細胞で、多種多様な組織、器官への分化誘導が可能である。しかし、細胞の樹立にヒトの受精卵を用いる必要があり、倫理的問題がある。一方、骨髄間質由来の幹細胞であるMS細胞は再生医療のうち、骨、筋および脂肪組織の再生に有用であると考えられている。また体細胞であるため倫理的問題はなく、成人の体から比較的容易に採取することができる。しかし、骨髄間質には多種多様な細胞が含まれるので多能性を有するMS細胞のみを単離するのは困難であり、MS細胞が得られても他細胞の混入によって増殖培養中に損失する確率が高く、移植治療には解決されるべき問題が多くある。また、採取時に麻酔が必要であることからドナーの負担が大きいことも問題となっている。

#### 【0007】

移植にはまとまった数の細胞が必要とされるため、再生医療の進展には簡単かつ安価に大量供給可能なドナー細胞の開発が必要不可欠である。幹細胞が再生医療のドナー細胞として集中的に研究されているが、これらのES細胞あるいはMS細胞の供給、維持、培養には特殊な試薬、機器および技術が必要であり、莫大な費用がかかる。これらの問題の解決において、多能性および自己複製能力を有し、さらに簡単に採取可能であり、かつ安定して特性が維持される細胞を得ることが必要であり、それらの条件を満たす細胞培養方法の確立が望まれる。

#### 【0008】

そこで本発明者はこれらの問題点を解決するために、従来の再生医療用ドナー細胞に対する考え方から大きく離れて、生体の各部位の体表面に存在する成熟脂肪細胞に着目した。

成熟細胞とは分化が終了した細胞であり、終末分化した細胞は脱分化しないと一般的に考えられている。しかし、本発明者は成熟脂肪細胞の脱分化を誘導し、前駆脂肪細胞株を樹立する新しい培養方法を確立することに成功した（特許文献

1)。この培養方法により樹立された前駆脂肪細胞株は均一で、維持、培養が容易であり、かつ特別な技術あるいは施設等が不必要である。したがって幹細胞における問題点をほぼ解決する新規の再生医療用ドナー細胞として期待される。

#### 【0009】

本発明者らが開発した前駆脂肪細胞株は皮下などの体表近くに存在する成熟脂肪細胞を由来とする。成熟脂肪細胞は他細胞の混入がない単一な細胞群として簡単に採取ができ、ドナー側の負担が少ない状態で大量かつ容易に採取することができる。また、新生児から高齢者まで皮下脂肪は存在するため、年齢を問わずドナー細胞を得ることができ、自家移植も可能である。免疫的な問題をクリアすれば、美容整形外科等において廃棄される脂肪細胞等を利用するなど、工業的に量産ができる可能性も高い。

本発明者が開発した成熟脂肪細胞を前駆細胞に脱分化させる培養方法およびその前駆脂肪細胞株を用い、骨細胞、筋細胞などの他の機能を持つ細胞へ分化転換させる培養方法を確立し、組織や器官の形成を行うことが、再生医療の自家移植システムの構築において望まれる。

#### 【0010】

##### 【従来の技術】

【特許文献1】 特開2000-83656号公報

#### 【0011】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、動物の脂肪組織由来の成熟脂肪細胞を脱分化させた前駆細胞を用い、他の細胞への分化転換を誘導する培養方法および該方法により樹立された細胞に関する。さらに該方法により樹立された細胞より組織、器官を形成し、再生医療へ応用することに関する。

#### 【0012】

##### 【課題を解決するための手段】

すなわち、本発明は、次のとおりの他の細胞への分化転換を誘導する培養方法、及びこのような培養方法を用いて分化転換された細胞に関する。

1) 脂肪組織由来の成熟脂肪細胞を脱分化させた前駆脂肪細胞を用い、他の細

胞への分化転換を誘導する培養方法。

2) 脂肪組織由来の成熟脂肪細胞が皮下組織由来の成熟脂肪細胞である前記1)に記載される培養方法。

3) 分化転換された他の細胞が骨芽細胞である前記1)に記載される培養方法。

4) 分化転換された他の細胞が筋芽細胞である前記1)に記載される培養方法。

5) 前記1)～4)のいずれかの培養方法を用いて分化転換させた、成熟脂肪細胞由来の細胞。

6) 細胞が骨芽細胞である前記5)に記載される細胞。

7) 細胞が筋芽細胞である前記5)に記載される細胞。

#### 【0013】

本発明における脂肪組織由来の成熟脂肪細胞の脱分化は、たとえば、本発明者らによってなされた特開2000-83656号公報によっておこなうとよい。すなわち、動物の単胞性脂肪細胞を天井培養して形成される線維芽細胞様脂肪細胞を継代培養して分化誘導することによって前駆細胞を得ることができる。このような細胞として、ヒト、ブタ、ウシ、ニワトリ等の脂肪組織由来の成熟細胞を挙げることができる、また、単胞性脂肪細胞としては、皮下脂肪組織、内臓脂肪組織等に由来する細胞が望ましい。

#### 【0014】

このようにして、成熟脂肪細胞から脱分化された前駆脂肪細胞を骨芽細胞又は筋芽細胞に分化転換する。この分化転換の方法としては、従来の細胞の分化転換に用いられるいずれの方法でも用いることができるが、特に、前記前駆脂肪細胞株を血清添加培地に浮遊させ、これを、コラーゲンを塗布した組織培養皿あるいはフラスコに播種し、5%炭酸ガス、95%空気の気相に調節した炭酸ガス培養装置内で培養し、コンフルエントに到達したら、培地を分化誘導培地に交換し、10～20日間培養を行う。

#### 【0015】

この分化誘導培地は、従来分化誘導培地として用いられるいずれの培地を用いてもよいが、例えば骨芽細胞ではデキサメタゾンあるいは活性ビタミンD<sub>3</sub>、アスコルビン酸、 $\beta$ -グリセロリン酸及び血清を添加したダルベッコ変法イーグル



培地を用い、10～20日間培養を行うとよい。筋芽細胞では、ハイドロコルチゾン及び血清を添加したダルベッコ変法イーグル培地を用い、10～18日間培養を行うとよい

#### 【0016】

このようにして培養した細胞から分化転換された骨芽細胞の同定は、アルカリホスファターゼ染色および比活性値の測定、オステオカルシン抗体による免疫染色、フォンコッサ染色法および石灰化した細胞外マトリックスの形成を指標として行うとよい。

そして、この培地から骨芽細胞の分離は、まず培地から細胞を遊離させ、細胞を培養液のなかに懸濁させ、遠心分離することによって上層に脂肪滴を蓄積した脂肪細胞が、下層（沈澱画分）に骨芽細胞が分離されるので、この下層の骨芽細胞を採取することによって行われる

筋芽細胞の同定には、筋決定因子であるMyf5、MyoDおよびミオゲニン抗体による免疫染色法を指標として行うとよい。

#### 【0017】

##### 【発明の実施の形態】

次に本発明を具体化した実施例を示すが、本発明は、いかなる場合でもこのような実施例に限定して解釈されるものではない。

#### 【0018】

##### <実施例1> (1) 成熟脂肪細胞の骨芽細胞への分化転換誘導

ヒト、ブタ、マウス、ラットまたはニワトリの皮下脂肪あるいは内臓脂肪組織中の成熟脂肪細胞を用いて、特開2000-83656号公報に記載した方法で成熟脂肪細胞由来の前駆脂肪細胞株（PA）を作出する。

作出されたPAを  $1 \times 10^4$  cells/ml となるように20%血清添加したダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）に再浮遊する。その後、コラーゲンタイプ1あるいは3を塗布した組織培養用の培養皿（Falcon, 3001）あるいはフラスコ（Falcon, 3107）中に播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%空気の気相に調節した炭酸ガス培養装置内に静置して培養した。なお、培地の交換は4日ごとに交換した。培養8日後、コンフルエントに到達したPAの培地を0.1μMデキサメタゾン（あるいは0.01μ

M活性ビタミンD3、50  $\mu$ M アスコルビン酸、10mM グリセリン酸および10%血清添加したDMEM（分化誘導培地）に交換し、10～18日間培養した。

### 【0019】

#### (2) 骨芽細胞の同定方法

培養された細胞が骨芽細胞に分化されていることを次の方法で同定した。すなわち、骨芽細胞の同定は、アルカリホスファターゼ染色および比活性値の測定、オステオカルシン抗体による免疫染色、フォンコッサ染色法および石灰化した細胞外マトリックスの形成を指標として行った。

##### 1) アルカリホスファターゼ (AP) およびオイルレッド (OR) 0染色

分化誘導8日後に以下に示す方法で細胞を固定したのち、アルカリホスファターゼ (AP) およびオイルレッド (OR) 0で二重染色した。培養皿中の分化誘導培地に1mlの4%ホルマリン液を添加し、室温で20分間静置して前固定を行なった。前固定液を除去したのち、新たに2mlの4%ホルマリン液を加え、室温で1時間静置した。固定液を除去したのち、2mlの蒸留水で3回洗浄した。40 mgのファストブルーBB（和光純薬）を溶解した0.1M トリス緩衝液 (Tris-HCl pH9.0) 50 mlに8 mgナフトールAS-TRホスフェートNa (SIGMA) を予め添加した0.5 ml n-nジメチルホルムアミド（和光純薬）を混合した。さらにMgCl<sub>2</sub>を加えた混合液を濾過し、AP染色液を準備した。ついで、準備したAP染色液を2mlを加え、37℃の恒温槽内に1時間静置した。AP染色液を除去したのち、2mlの蒸留水で3回洗浄した。引き続き、0.5gのオイルレッド0 (SIGMA) 添加した100mlのイソプロピルアルコールと蒸留水を3:2の比率で混合したのち濾過した。2mlのOR0染色液を加え、室温で20分間静置した。

### 【0020】

##### 2) オステオカルシン抗体による免疫染色

分化誘導16日後に上記と同様の固定方法を用いて細胞を固定したのち、リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄した。2%過酸化水素水PBSで3回洗浄して内因性パーオキシダーゼ活性を阻害した。さらに、内因性アビジン-ビオチンを阻害しのち、正常血清添加PBSで20分間ブロッキングしたのち、オステオカルシン抗体（400倍希釈）を4℃、20時間反応させた。PBSで2回洗浄後、希釈ビオチン化2次抗体で3

0分間反応させたのち、PBSで2回洗浄した。ついで、ABC試薬で60分間反応させた。反応後、Tris-HClで洗浄したのち、10分間DAB染色した。蒸留水で3回洗浄したのち、観察に供試した。

#### 【0021】

##### 3) フォンコッサ染色法 (von Kossa histochemical methods)

分化誘導16日後に上記と同様の固定方法を用いて細胞を固定したのち、リン酸緩衝液 (PBS) で3回洗浄した。5%硝酸銀PBSで紫外線照射しながら60分間浸漬した。蒸留水で注意深く3回洗浄したのち、5%チオ硫酸ナトリウム溶液に3分間浸漬した。蒸留水で2回洗浄後、観察に供試した。

#### 【0022】

このようにして得られた骨芽細胞の顕微鏡写真を図1～4に示した。これらの図に見られるように成熟脂肪細胞に由来する前駆脂肪細胞が骨芽細胞に分化転換されていることが確認された。

#### 【0023】

##### <実施例2> 骨芽細胞と脂肪細胞の分離方法

細胞をカルシウムおよびマグネシウム欠のPBSで3回洗浄したのち、0.1%トリプシンおよび0.01%EDTA添加PBSで3分間処理した。細胞が完全に遊離したのを確認したのち、20%ウシFCS添加DMEMを加えて細胞を浮遊させた。細胞を遠沈管に移したのち800Gで遠心分離して、上層に脂肪滴を蓄積した脂肪細胞と沈殿画分に骨芽細胞が分離される。上層の脂肪細胞を除去すると、沈殿画分に骨芽細胞が得られる。

#### 【0024】

##### <実施例3> (1) 成熟脂肪細胞の筋芽細胞への分化転換誘導

ヒト、ブタ、マウス、ラットまたはニワトリの皮下脂肪あるいは内臓脂肪組織中の成熟脂肪細胞を用いて、特開2000-83656号公報に記載した方法で成熟脂肪細胞由来の前駆脂肪細胞株 (PA) を作出する。

作出されたPAを  $1 \times 10^4$  cells/ml となるように20%血清添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) に再浮遊する。その後、コラーゲンタイプ1あるいは3を塗布した組織培養用の培養皿 (Falcon, 3001) あるいはフラスコ (Falcon,

3107) 中に播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%空気の気相に調節した炭酸ガス培養装置内に静置して培養した。なお、培地の交換は4日ごとに交換した。培養8日後、コンフルエントに到達したPAの培地を50μMヒドロコルチゾン、10%血清添加したDMEM (分化誘導培地) に交換し、10~18日間培養した。

#### 【0025】

##### (2) 筋芽細胞の同定方法

培養された細胞が筋芽細胞に分化されていることを次の方法で同定した。すなわち、骨芽細胞の同定は、筋芽細胞の決定因子であるMyf5、MyoDおよび筋細胞のコミットメント因子であるミオゲニン抗体による免疫染色を指標として行った。

##### 1) Myf5およびMyoD抗体による免疫染色

分化誘導4日後に以下に示す方法で細胞を固定した。培養皿中の分化誘導培地と等量の4%ホルマリン液を添加し、室温で20分間静置して前固定を行なった。前固定液を除去したのち、新たに2mlの4%ホルマリン液を加え、室温で1時間静置した。固定液を除去後、リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄した。2%過酸化水素水PBSで3回洗浄して内因性パーオキシダーゼ活性を阻害した。さらに、内因性アビジン-ビオチンを阻害し、正常血清添加PBSで20分間ブロッキングしたのち、Myf5あるいはMyoD抗体 (400倍希釈) を4℃、20時間反応させた。PBSで2回洗浄後、希釈ビオチン化2次抗体で30分間反応させたのち、PBSで2回洗浄した。ついで、ABC試薬で60分間反応させた。反応後、Tris-HClで洗浄したのち、10分間DAB染色した。蒸留水で3回洗浄したのち、観察に供試した。

#### 【0026】

##### 2) ミオゲニン抗体による免疫染色

分化誘導10~18日後に上記と同様の固定方法を用いて細胞を固定したのち、リン酸緩衝液 (PBS) で3回洗浄した。2%過酸化水素水PBSで3回洗浄して内因性パーオキシダーゼ活性を阻害した。さらに、内因性アビジン-ビオチンを阻害し、正常血清添加PBSで20分間ブロッキングしたのち、ミオゲニン抗体 (300倍希釈) を4℃、20時間反応させた。PBSで2回洗浄後、希釈ビオチン化2次抗体で30分間反応させたのち、PBSで2回洗浄した。ついで、ABC試薬で60分間反応させた。反応後、Tris-HClで洗浄したのち、10分間DAB染色した。蒸留水で3回洗浄した

のち、観察に供試した。

#### 【0027】

このようにして得られた筋芽細胞の顕微鏡写真を図5～7に示した。これらの図に見られるように成熟脂肪細胞に由来する前駆脂肪細胞が筋芽細胞に分化転換されていることが確認された。分化転換誘導18日後には殆どの細胞が筋芽細胞特異的なマーカーを発現する。

#### 【0028】

##### 【発明の効果】

本発明の効果を列挙すると次のとおりである。

(1) 本発明は、前駆脂肪細胞から骨芽細胞への分化転換機構解明のための唯一の培養系である。これまで、脂肪細胞および骨細胞は同じ中胚葉性幹細胞を起源にもつことが知られているが、その分化の方向性は幹細胞からそれぞれの前駆細胞へて脂肪細胞や骨細胞へと数末分化すると考えられてきた。本発明は、それらの常識を覆し、成熟脂肪細胞を脱分化させることによって得られた前駆脂肪細胞を骨芽細胞へと分化転換させることが可能である唯一の培養方法として、分化転換機構の解明に著しく貢献する。

#### 【0029】

(2) 新規の再生医療用のドナー細胞として以下のような効果がある。

1) 皮下脂肪を用いるので採取しやすく、ドナーの麻酔による危険性が低く、負担が少ない。

2) 多数の細胞が採取されるので、多くの成熟脂肪細胞数が得られ、それに比例して多数の骨芽細胞を得ることができる。従って骨芽細胞の採取が著しく低コストで行うことができる。

3) 成熟脂肪細胞はその構造から、単一な細胞群として採取することができるので、均一な細胞群が特別な機器がなくても簡単に分採することができる。

4) 成熟脂肪細胞由来の前駆細胞は線維芽細胞であるので、取り扱いが容易で特別な培養技術を必要としない。

5) 新生児から高齢者まで皮下脂肪は存在するので、治療対象者の年齢を問わず実施できる。

6) 受精卵を用いず実施できるので、倫理面の制約を受けることがない。また、美容整形外科等で廃棄されるものも再利用することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

実施例の成熟脂肪細胞に由来する前駆脂肪細胞を分化転換した骨芽細胞の顕微鏡写真を示す。

- A. 分化誘導28日後におけるアルカリホスファターゼ陽性の骨芽細胞を示す。
- B. 倍率を高めたアルカリホスファターゼ陽性細胞の形態を示す(倍率 倍)。アルカリホスファターゼ陽性細胞が骨芽細胞特有の形態を示している。

【図 2】

実施例の成熟脂肪細胞に由来する前駆脂肪細胞を分化転換した骨芽細胞の顕微鏡写真を示す。

- A. 分化誘導4日後におけるマウス胎子頭蓋骨由来のアルカリホスファターゼ陽性の骨芽細胞(対照区)。
- B. 分化誘導14日後における成熟脂肪細胞由来の骨芽細胞(青)を示す。骨芽細胞(青)と脂肪細胞(赤)とが混在する。

【図 3】

実施例のオステオカルシンを分泌した成熟脂肪細胞由来の骨芽細胞の顕微鏡写真を示す。

矢印は、骨芽細胞への分化誘導24日後におけるオステオカルシン抗体および染色された成熟脂肪細胞由来の骨芽細胞を示す。

【図 4】

実施例の成熟脂肪細胞由来の骨芽細胞の骨マトリックス(カルシウムの沈着)の形成を顕微鏡写真にて示す。

矢印は、分化誘導20日後にコッサ染色されたカルシウム沈着部分が染色されている。

【図 5】

実施例の成熟脂肪細胞に由来する前駆脂肪細胞を分化転換した筋芽細胞の顕微鏡写真を示す。

- A. 対照区。核内にMyf5を発現していない。
- B. 分化誘導 4 日後、殆どの細胞の核内にMyf5が発現が観察される。

【図 6】

実施例の成熟脂肪細胞に由来する前駆脂肪細胞を分化転換した筋芽細胞の顕微鏡写真を示す。

分化誘導 6 日後、殆どの細胞の核内にMyoDが発現が観察される。

【図 7】

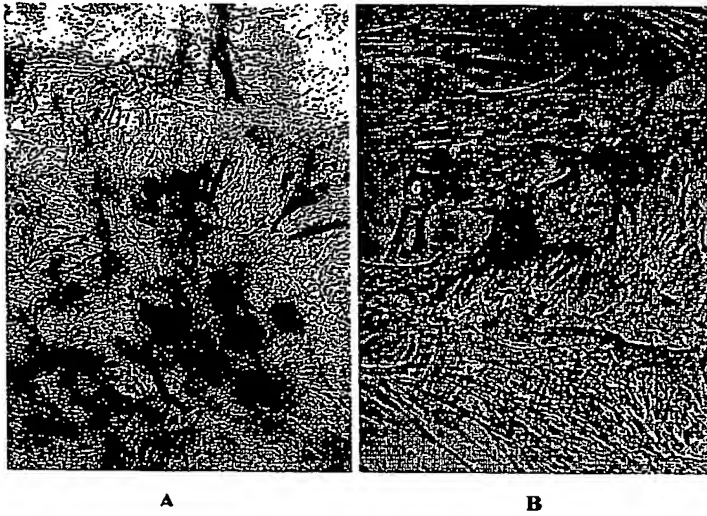
実施例のミオゲニンを発現した成熟脂肪細胞由来の筋芽細胞の顕微鏡写真を示す。

分化誘導18日後、殆どの細胞の核内にミオゲニンの発現が観察される。

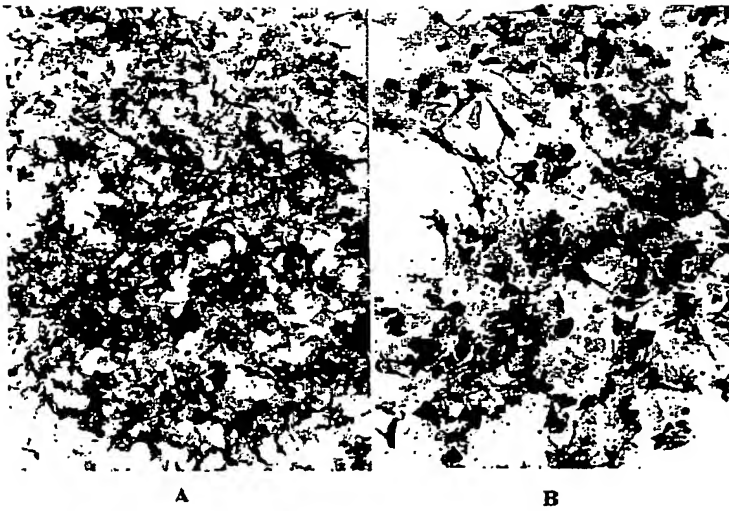
65

【書類名】 図面

【図 1】

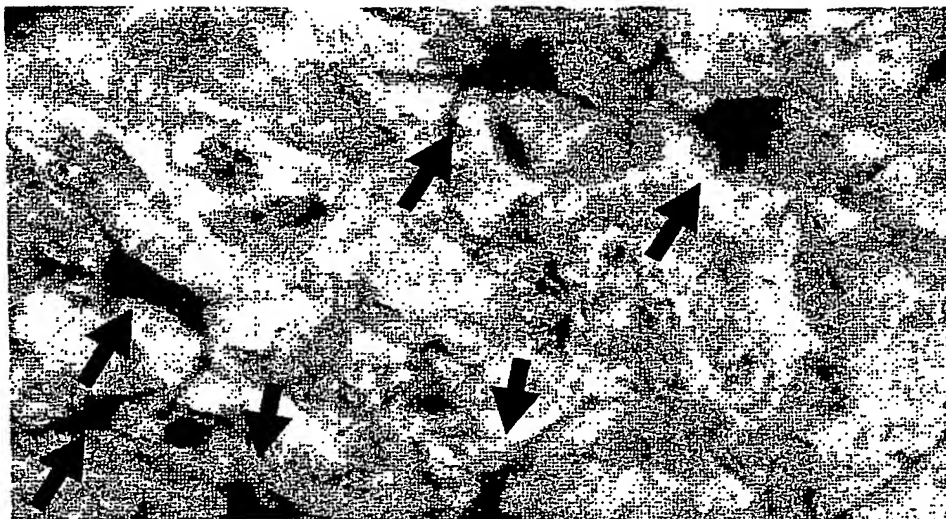


【図 2】

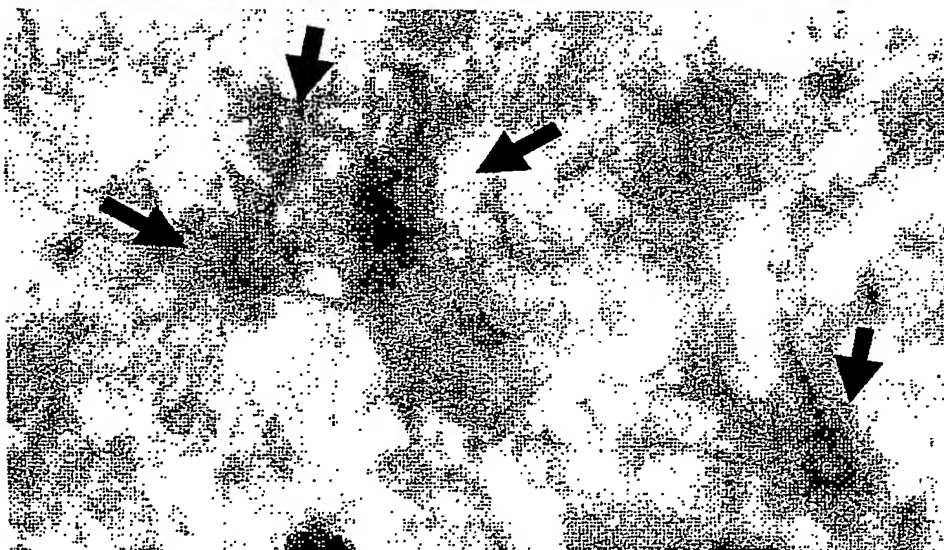




【図 3】

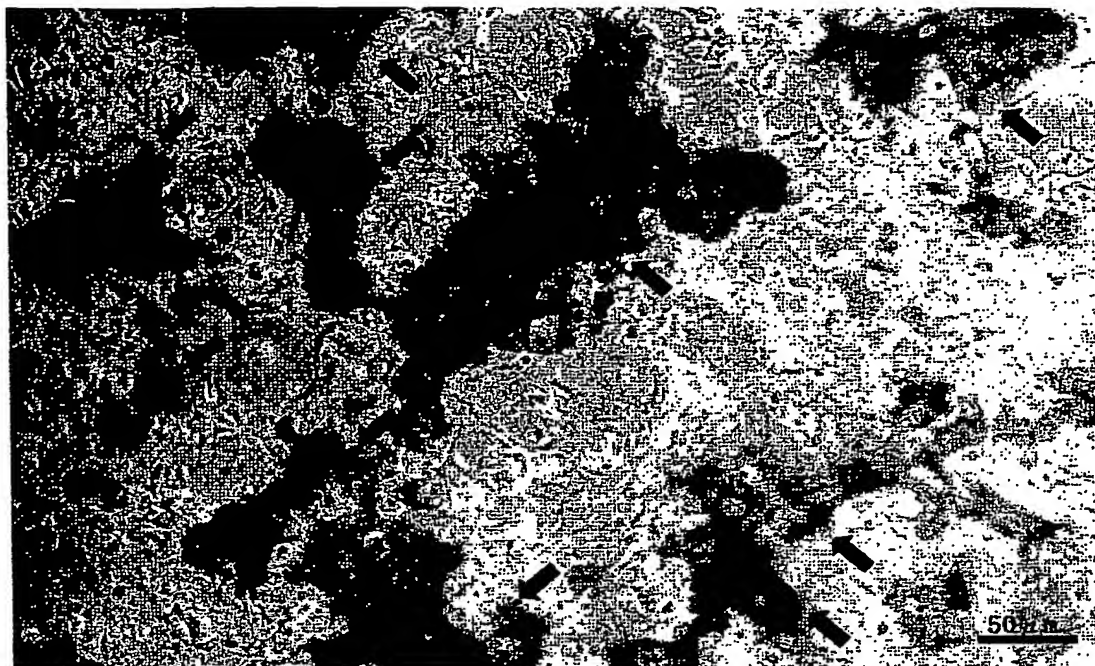


A

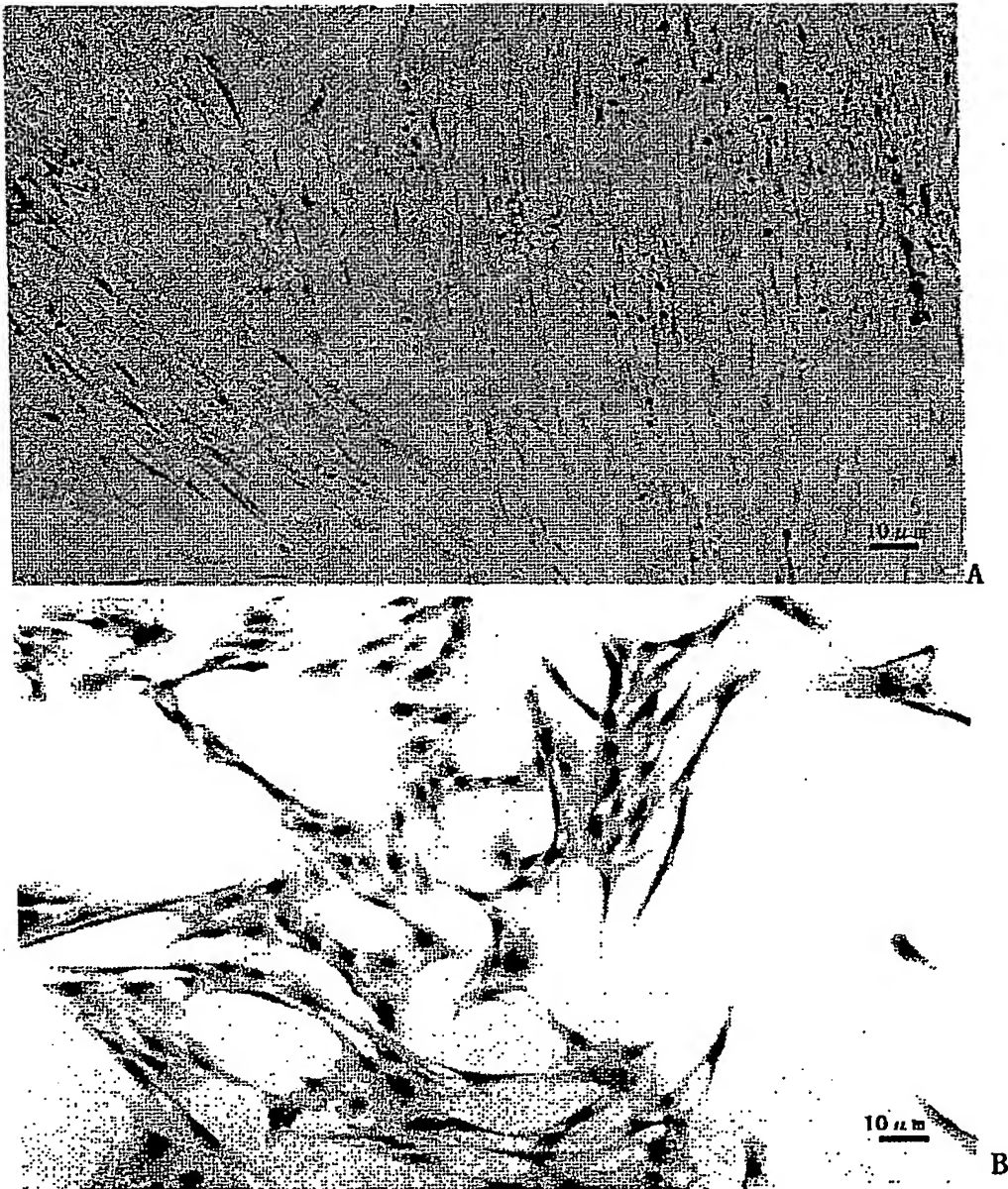


B

【図 4】



【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 成熟脂肪細胞由来の骨芽細胞および筋芽細胞の作出。

【解決手段】 脂肪組織由来の成熟脂肪細胞を脱分化させて前駆細胞とし、この前駆細胞を骨芽細胞あるいは筋芽細胞に分化転換する。これらの骨芽細胞および筋芽細胞の作出方法、及び作出された骨芽細胞、筋芽細胞。

簡単かつ大量に産生することができ、再生医療用ドナー細胞として有用である。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 1 7 0 0 1 1
受付番号	5 0 3 0 0 9 9 7 4 6 4
書類名	特許願
担当官	関 浩次 7 4 7 5
作成日	平成 1 5 年 6 月 1 6 日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 6月13日
-------	-------------

次頁無

特願 2003-170011

出願人履歴情報

識別番号

[899000057]

1. 変更年月日

1999年 9月17日

[変更理由]

新規登録

住所

東京都千代田区九段南四丁目8番24号

氏名

学校法人日本大学

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**